

การขยายพันธุ์ในหลอดแก้วของกล้วยไม้กระร่อน (*Cymbidium aloifolium* (L.) Sw.)

กล้วยไม้ป่าใกล้สูญพันธุ์ในกลุ่มป่าชุมชน

จตุพร หงษ์ทองคำ* และ รชยา พรอมวงศ์

ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยราชภัฏร้อยเอ็ด อ.เสลภูมิ จ.ร้อยเอ็ด 45120

บทคัดย่อ

กล้วยไม้กระร่อน (*Cymbidium aloifolium* (L.) Sw.) เป็นกล้วยไม้ป่าประเภทอิงอาศัยที่เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ไปจากธรรมชาติ เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมและการกระทำของมนุษย์ ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสูตรอาหารต่อการงอกของเมล็ดและผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มกล้วยไม้กระร่อนในสภาพปลอดเชื้อ โดยนำเมล็ดกล้วยไม้จากฝักที่มีอายุ 6 เดือน มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ สูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และอาหารสูตร ND ที่เติมน้ำตาลซูโครส 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 วัน พบว่า อาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมต่อการงอกของเมล็ดกล้วยไม้กระร่อนคือ อาหารสูตร ND โดยมีเปอร์เซ็นต์การงอกสูงที่สุดคือ 100 เมล็ดที่งอกสามารถเจริญเป็นโปรโตคอร์มได้ภายใน 20-25 วัน เมื่อนำโปรโตคอร์มที่มีอายุ 50 วัน มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ND ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0, 0.5 และ 1 มก./ล. ร่วมกับ BA หรือ Kn ที่ระดับความเข้มข้น 0, 1, 3 และ 5 มก./ล. เป็นเวลา 90 วัน พบว่า โปรโตคอร์มที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มก./ล. เกิดยอดได้ดีที่สุด โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ย 7.27 ยอด/โปรโตคอร์ม ขณะที่อาหารที่เติม NAA ความเข้มข้น 1 มก./ล. ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 5 มก./ล. ต้นอ่อนเกิดรากได้ดีที่สุด โดยมีจำนวนรากเฉลี่ย 3.40 ราก/ต้น และต้นอ่อนมีความสูงเฉลี่ยสูงสุด 12.47 ซม. เมื่อย้ายต้นอ่อนออกปลูกในสภาพโรงเรือนเป็นเวลา 30 วัน พบว่า กล้วยไม้ที่ปลูกในกระถางที่มีกาบมะพร้าวสับมีอัตราการรอดชีวิตสูงสุดคือ 83 เปอร์เซ็นต์ ผลการศึกษาในครั้งนี้ สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้กระร่อนเพื่อเพิ่มปริมาณในหลอดทดลอง และเพื่อเป็นประโยชน์ในการอนุรักษ์พันธุ์กล้วยไม้ชนิดนี้ต่อไป

คำสำคัญ: กล้วยไม้กระร่อน, สารควบคุมการเจริญเติบโต และโปรโตคอร์ม

* ผู้เขียนให้ติดต่อ: E-mail: jatuporn_h@hotmail.com

In vitro Propagation of KareKaron (*Cymbidium aloifolium* (L.) Sw.)
an Endangered Wild Orchid in Community Forestry

Jatuporn Hongthongkham^{*} and Rachaya Promwong

*Department of Science and Technology, Faculty of Liberal Arts and Science,
Roi Et Rajabhat University, Selaphum, Roi Et, 45120, Thailand*

Abstract

Kare Karon (*Cymbidium aloifolium* (L.) Sw.) is a wild epiphytic orchid that is at risk of extinction because of environmental changes and human behavior. The aims of this study were to investigate the effect of media on seeds germination and effect of growth regulators on protocorms growth of *C. aloifolium*. Six months old seeds derived from pod were cultured on MS medium supplemented with 3% sucrose and ND medium supplemented with 1% sucrose for 30 days. The results showed that ND medium was suitable for seed germination, as it had the highest germination percentage (100%) and germinated seeds developed into protocorms within 20-25 days. Fifty-day-old protocorms were cultured on ND medium supplemented with 0, 0.5 and 1 mg/L NAA combined with 0, 1, 3, and 5 mg/L BA or Kinetin (Kn) for 90 days. Protocorms cultured on a medium with 1 mg/L BA showed the highest average number of shoot (7.27 shoot number/protocorm). The highest average number of roots/shoot was 3.40 and the maximum seedling height was 12.47 cm were found on medium supplemented with 1 mg/L NAA and 5 mg/L Kn. The seedlings were transferred to pots and grown in greenhouse condition for 30 days. The results showed that the highest survival percentage was 83 when transplanted to pots containing coconut husk chops. The data obtained from this study can be applied for multiplication and conservation of this orchid species.

Keywords: *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw., Growth regulators and Protocorms

^{*} Corresponding author: E-mail: jatuporn_h@hotmail.com

บทนำ

กล้วยไม้เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวกลุ่มใหญ่ อยู่ในวงศ์ Orchidaceae พบทั่วโลกมากกว่า 700-800 สกุล 25,000 ชนิด (Singh and Voletri, 1995) ในประเทศไทยมีการสำรวจและตรวจสอบรายชื่อเรียบร้อยแล้วทั้งสิ้น 177 สกุล จำนวน 1,125 ชนิด (Kongbangkerd *et al.*, 2007) ซึ่งเห็นได้ชัดว่ากล้วยไม้ป่าไทยมีความหลากหลายทั้งถิ่นที่อยู่และพันธุกรรมไม่น้อยไปกว่าประเทศเขตร้อนอื่นๆ แต่ในปัจจุบันพบว่า การทำลายสภาพนิเวศไม่ว่าจะเป็นการตัดไม้เผาป่าเพื่อทำไร่เลื่อนลอย ส่งผลกระทบต่อความอยู่รอดของพันธุ์กล้วยไม้ป่าทั้งสิ้น นอกจากนี้การนำกล้วยไม้ป่าออกมาเพื่อจำหน่ายทั้งในระดับท้องถิ่นหรือรวบรวมโดยพ่อค้าเพื่อส่งออกไปยังต่างประเทศ ถือได้ว่าเป็นการลดปริมาณของกล้วยไม้ป่าในธรรมชาติลงอย่างมาก (Borasee and Theanhom, 2014) จากสาเหตุดังกล่าวนี้ทำให้กล้วยไม้ป่าของไทยหลายชนิดมีปริมาณลดลง และบางชนิดใกล้สูญพันธุ์ไปจากแหล่งที่อยู่เดิม

กล้วยไม้ป่ากะเหรี่ยง (*Cymbidium aloifolium*(L.) Sw.) เป็นกล้วยไม้ประเภทอิงอาศัยพบในป่าเต็งรัง ป่าผลัดใบและป่าไม่ผลัดใบ ตามที่โล่งแจ้งมีแสงแดดจัด มีลำต้นขนาดสั้นเกาะรวมกันเป็นกระจุกแน่น ออกดอกเป็นช่อสายห้อยลง กลีบดอกสั้นสีเหลืองมีลักษณะเป็นแถบ แถบจะมีสีม่วงหรือสีน้ำตาลอมแดงขอบสีขาว นิยมปลูกเพื่อเป็นไม้ประดับ นอกจากนี้ยังมีสรรพคุณทางยา โดยใช้ส่วนของใบเพื่อห้ามเลือด ส่วนรากใช้รักษาอาการเจ็บป่วยเรื้อรัง และส่วนของต้นใช้รักษาแผลไฟไหม้ ฝี เวียน และบรรเทาความอ่อนล้าของสายตา (Pradhan *et al.*, 2014) อันเป็นเหตุให้ความต้องการนำกล้วยไม้ป่ากะเหรี่ยงออกจากธรรมชาติมาใช้เป็นสมุนไพรรักษาโรคและการค้ามีจำนวนมากขึ้น นอกจากนี้การบุกรุกป่าเพื่อทำการเกษตร รวมถึงการเกิดไฟป่าเป็นการทำลายถิ่นที่อยู่ของกล้วยไม้ป่ากะเหรี่ยง และการลักลอบนำต้นกล้วยไม้ป่าออกมาจากป่าเพื่อการค้าส่งผลให้กะเหรี่ยงในป่าธรรมชาติรวมถึงป่าชุมชนมีจำนวนลดน้อยลง ปัจจุบันพบว่า กล้วยไม้หลายชนิดรวมถึงกล้วยไม้กะเหรี่ยงได้ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม Vulnerable ซึ่งหมายถึงพืชที่จะเข้าสู่สถานะอันตรายที่ใกล้จะสูญพันธุ์ไปจากแหล่งที่มีการกระจายพันธุ์ และหากยังไม่มีการดำเนินการอนุรักษ์ไว้

อาจทำให้กล้วยไม้กะเหรี่ยงในประเทศไทยสูญพันธุ์ได้ในที่สุด ดังนั้นหากนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเข้ามาใช้ในการขยายพันธุ์กะเหรี่ยงจะเป็นวิธีการที่รวดเร็วที่สุดในการอนุรักษ์กล้วยไม้ในระยะสั้นไปจนถึงระยะยาวได้

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (plant tissue culture) เป็นวิธีการขยายพันธุ์ที่ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายเนื่องจากสามารถเพิ่มปริมาณต้นได้เป็นจำนวนมากในระยะเวลานาน นอกจากนี้ต้นที่ได้ยังมีความสมบูรณ์ปราศจากโรคต่างๆ และยังสามารถลดข้อจำกัดในการขยายพันธุ์ตามธรรมชาติของกล้วยไม้ที่ขยายพันธุ์ยากได้ ซึ่งปกติแล้วกล้วยไม้ใช้เมล็ดในการขยายพันธุ์ แต่เนื่องจากเมล็ดกล้วยไม้มีขนาดเล็กและไม่มีอาหารสะสมหรือมีอยู่น้อยมากจึงต้องอาศัยเชื้อราไมคอร์ไรซา (Mycorrhiza) เพื่อช่วยในการงอก และหากเมล็ดกล้วยไม้ตกอยู่ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมอาจไม่เกิดการงอกได้ นอกจากนี้การเจริญเติบโตของกล้วยไม้ตามธรรมชาติมีการเจริญเติบโตค่อนข้างช้า ทำให้ต้นอ่อนไม่สามารถเจริญทดแทนต้นเก่าได้ทันเวลา ดังนั้นหากนำเอาเทคนิคการเพาะเลี้ยงพืชเข้ามาใช้ในการขยายพันธุ์กล้วยไม้ จะช่วยลดข้อจำกัดที่มีอยู่ตามธรรมชาติได้ อย่างไรก็ตาม กล้วยไม้แต่ละชนิดมีวิธีการขยายพันธุ์ การเจริญเติบโต และความต้องการปริมาณสารอาหารที่แตกต่างกัน การศึกษาในครั้งนี้จึงมุ่งศึกษาการขยายพันธุ์กล้วยไม้ป่ากะเหรี่ยงโดยใช้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อเพิ่มปริมาณต้นกล้วยไม้ให้ได้จำนวนมากในระยะเวลานาน และเพื่อเป็นแนวทางในการขยายพันธุ์และอนุรักษ์พันธุ์กล้วยไม้ชนิดอื่นต่อไป ดังนั้น วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้จึงดำเนินการเพื่อศึกษาผลของสูตรอาหารต่อการงอกของเมล็ดและศึกษาผลสารควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่ NAA, BA และ Kinetin (Kn) ต่อการเพิ่มจำนวนยอด และการเกิดรากของโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ป่ากะเหรี่ยง

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การศึกษาสูตรอาหารต่อการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ป่ากะเหรี่ยง

นำฝักกล้วยไม้ป่ากะเหรี่ยงที่ได้จากการผสมตัวเองเป็นเวลา 6 เดือน มาตัดส่วนหัวและส่วนปลายของฝักกล้วยไม้เล็กน้อย จากนั้นล้างฝักด้วยน้ำสะอาด และ

ฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวของผักโดยจุ่มในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ แล้วเผาผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง ผ่าผักกล้วยไม้ดอกตามแนว ยาว แล้วใช้ปากคีบเขี่ยเมล็ดกล้วยไม้ลงในอาหารสังเคราะห์ ที่มีวุ้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ (w/v) 2 สูตร ได้แก่ อาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่มีน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และอาหารสูตร ND (Tokuhara and Mii, 1993) ที่มีน้ำตาลซูโครส 1 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยงภายใต้ อุณหภูมิ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ความชื้นแสง 3,000 ลักซ์ ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 30 วัน วางแผนการทดลองแบบสุ่ม สมบูรณ์ (Completely randomized design: CRD) แต่ละ สูตรอาหารทำ 5 ซ้ำๆ ละ 10 ขวด เปรียบเทียบประสิทธิภาพ การออกของเมล็ดกล้วยไม้บนอาหารสังเคราะห์ทั้ง 2 สูตร โดยการสังเกตเมล็ดที่เริ่มมีการงอก ซึ่งจะแสดงลักษณะกลม และมีสีเขียว เพาะเลี้ยงต่อไปจนกระทั่งเมล็ดเจริญไปเป็น โปรโตคอร์ม

2. การศึกษาการควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเจริญของ โปรโตคอร์มกล้วยไม้ปากะระกระรอน

นำโปรโตคอร์มกะระกระรอนที่ได้จากการเพาะเลี้ยง เมล็ดบนอาหารสังเคราะห์สูตร ND ที่เติมน้ำตาลซูโครส 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 50 วัน เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมที่ เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 0, 0.5 และ 1 มก./ล. และ BA หรือ Kn ความเข้มข้น 0, 1, 3 และ 5 มก./ล. เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ความชื้นแสง 3,000 ลักซ์ ให้แสง 16 ชม./วัน บันทึกผลโดยนับจำนวน ยอด จำนวนราก และวัดความสูงต้น ภายหลังจากการ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 90 วัน แต่ละการทดลองทำ 5 ซ้ำๆ ละ 25 โปรโตคอร์ม วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) นำข้อมูลที่บันทึกได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบจำแนก ทางเดียว (One-way ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่าง ระหว่างคู่ด้วย LSD (Least Significant Difference)

3. การศึกษาการย้ายต้นอ่อนกล้วยไม้ปากะระกระรอนออก ปลูกลงในสภาพโรงเรือน

นำต้นอ่อนกล้วยไม้กะระกระรอนที่มีราก 5-6 ราก/ต้น และมีใบ 3-4 ใบ จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ND ที่ เติมน้ำตาลซูโครส 1 เปอร์เซ็นต์ NAA ความเข้มข้น 1 มก./ล. และ Kn ความเข้มข้น 5 มก./ล. ย้ายลงปลูกใน กระถางที่มีวัสดุปลูก 3 ชนิด คือ กาบมะพร้าวสับ กาบ มะพร้าวสับและก้อนถ่าน (1:1) และ กาบมะพร้าวสับและเศษ

กระเบื้อง (1:1) วางเลี้ยงในโรงเรือนที่มีอุณหภูมิ $30-35^{\circ}\text{C}$ ความชื้นแสง 20 เปอร์เซ็นต์ แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำๆ ละ 30 ต้น สังเกตการเจริญเติบโต และบันทึกเปอร์เซ็นต์ การรอดชีวิตของต้นกล้วยไม้ โดยสังเกตการเจริญของ กล้วยไม้ ภายหลังจากการปลูกลงเป็นเวลา 30 วัน วาง แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) นำข้อมูลที่บันทึก ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบจำแนกทางเดียว (One-way ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างคู่ด้วย LSD (Least Significant Difference)

ผลการวิจัย

1. ผลของสูตรอาหารต่อการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ปากะระกระรอน

จากการศึกษาเปรียบเทียบสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อ การงอกของเมล็ดกล้วยไม้กะระกระรอน พบว่า เมล็ดกล้วยไม้ สามารถงอกได้ในอาหารสังเคราะห์ทั้ง 2 สูตร โดยมี เปอร์เซ็นต์การงอกแตกต่างกัน (Fig. 1) เมล็ดที่เพาะเลี้ยงบน อาหารสูตร ND ที่มีน้ำตาลซูโครส 1 เปอร์เซ็นต์ มีเปอร์เซ็นต์ การงอกสูงสุดคือ 100 ± 0.00 เมื่อเมล็ดเริ่มงอกจะเจริญเป็น โปรโตคอร์มได้ภายในเวลา 20-25 วัน ขณะที่เมล็ดที่ เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ มีเปอร์เซ็นต์การงอกเท่ากับ 90 ± 7.07 และเจริญ เป็นโปรโตคอร์มภายในเวลา 30-35 วัน ซึ่งโปรโตคอร์มที่ได้ จะมีรูปร่างกลมและมีสีเขียว (Fig. 2)

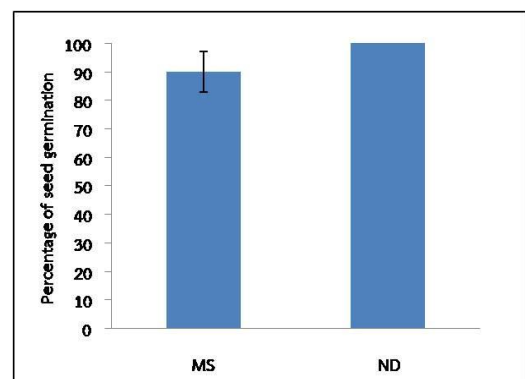


Fig. 1 Seed germination percentage of *C. aloifolium* on MS and ND medium for 30 days

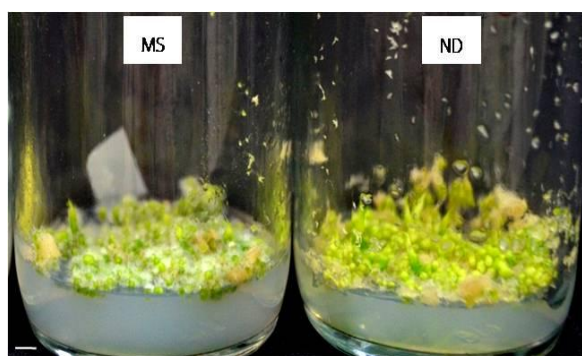


Fig. 2 Development of protocorms after 4 weeks of culture on MS and ND medium, Scale bar = 0.5 cm

2. ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเจริญของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ปากะเรกะร่อน

ในการศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเจริญของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ปากะเรกะร่อน โดยการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มบนอาหารสูตร ND ที่เติม NAA ร่วมกับ BA หรือ Kn ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ พบว่าอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตทุกความเข้มข้นสามารถชักนำให้โปรโตคอร์มปากะเรกะร่อนเจริญเป็นต้นได้ แตกต่างจากโปรโตคอร์มที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) (Table 1) โดยเฉพาะอย่างยิ่งโปรโตคอร์มที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มก./ล. สามารถชักนำให้โปรโตคอร์มเกิดยอดเฉลี่ยเพิ่มขึ้นสูงสุดคือ 7.27 ยอด/โปรโตคอร์ม ขณะที่โปรโตคอร์มที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม NAA ความเข้มข้น 1 มก./ล. ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 5 มก./ล. มีจำนวนรากเฉลี่ยสูงสุดคือ 3.40 ราก/ต้น และต้นอ่อนมีความสูงเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 12.47 ซม. (Fig. 3)

3. ผลการย้ายต้นอ่อนกล้วยไม้ปากะเรกะร่อนออกปลูกในสภาพโรงเรือน

จากการย้ายต้นอ่อนปากะเรกะร่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ND ที่เติมน้ำตาลซูโครส 1 เปอร์เซ็นต์ NAA 1 มก./ล. และ Kn 5 มก./ล. ลงปลูกในกระถางที่มีวัสดุปลูกแตกต่างกัน และวางเลี้ยงในโรงเรือนเป็นเวลา 30 วัน พบว่า ต้นอ่อนกล้วยไม้มีอัตราการรอดชีวิตที่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$) โดยเฉพาะอย่างยิ่งต้นอ่อนกล้วยไม้ที่ปลูกในกระถางที่มีกาบมะพร้าวสับมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต

สูงสุดคือ 83 ± 4.83 ขณะที่กระถางที่มีกาบมะพร้าวสับและถ่าน (1:1) และกาบมะพร้าวสับและเศษกระเบื้อง (1:1) ต้นอ่อนกล้วยไม้มีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 75 ± 5.27 และ 77 ± 4.83 ตามลำดับ (Fig. 4)

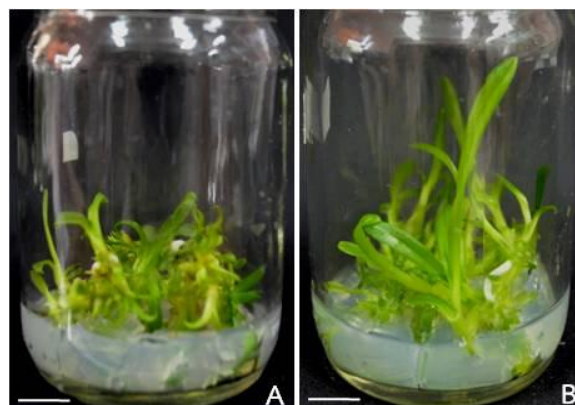


Fig.3 Shoots and roots formation of *C. aloifolium* protocorms after cultured on ND medium supplemented with growth regulators for 90 days (A) Culture on ND medium supplemented with 1 mg/L BA (B) Culture on ND medium supplemented with 1 mg/L NAA and 5 mg/L Kn, Scale bars = 1 cm



Fig.4 Seedlings development of *C. aloifolium* (A) after cultured on ND medium supplemented with 1 mg/L NAA and 5 mg/L Kn for 90 days. (B) Plantlets transplanted to pots containing coconut husks chops under greenhouse condition for 30 days, Scale bars = 1cm

Table1 Effects of growth regulators NAA, BA and Kn on average number of shoots, roots and height of *C aloifolium* protocorms

Growth regulators (mg/L)			Average number of	Average number of	Plant height
NAA	BA	Kn	shoots per protocorms $\pm$ SD	roots per shoot $\pm$ SD	(cm) $\pm$ SD
0	0	0	4.87 $\pm$ 0.17 ^g	1.33 $\pm$ 0.13 ^e	4.48 $\pm$ 0.19 ⁱ
0	1	-	7.27 $\pm$ 0.25 ^a	0.60 $\pm$ 0.16 ^{gh}	4.93 $\pm$ 0.15 ^h
0	3	-	7.20 $\pm$ 0.24 ^{ab}	0.53 $\pm$ 0.13 ^{gh}	3.87 $\pm$ 0.13 ^j
0	5	-	6.93 $\pm$ 0.33 ^{abc}	0.27 $\pm$ 0.12 ^h	1.60 $\pm$ 0.13 ^l
0.5	0	-	4.27 $\pm$ 0.15 ^{hij}	2.20 $\pm$ 0.11 ^d	10.20 $\pm$ 0.20 ^b
0.5	1	-	6.73 $\pm$ 0.15 ^{bc}	1.93 $\pm$ 0.15 ^d	5.73 $\pm$ 0.15 ^g
0.5	3	-	5.87 $\pm$ 0.13 ^d	0.87 $\pm$ 0.19 ^{fg}	4.93 $\pm$ 0.15 ^h
0.5	5	-	5.93 $\pm$ 0.18 ^d	0.20 $\pm$ 0.11 ^h	2.80 $\pm$ 0.14 ^k
1	0	-	4.47 $\pm$ 0.13 ^{ghi}	2.13 $\pm$ 0.17 ^d	3.07 $\pm$ 0.18 ^k
1	1	-	5.67 $\pm$ 0.13 ^d	2.13 $\pm$ 0.13 ^d	3.20 $\pm$ 0.17 ^k
1	3	-	5.00 $\pm$ 0.14 ^{ef}	0.07 $\pm$ 0.12 ^h	3.07 $\pm$ 0.12 ^k
1	5	-	4.60 $\pm$ 0.13 ^{fgh}	0.20 $\pm$ 0.11 ^h	1.73 $\pm$ 0.15 ^l
0	-	1	5.67 $\pm$ 0.16 ^d	0.60 $\pm$ 0.13 ^{gh}	6.13 $\pm$ 0.09 ^g
0	-	3	6.53 $\pm$ 0.17 ^c	0.47 $\pm$ 0.13 ^{gh}	5.27 $\pm$ 0.15 ^h
0	-	5	5.73 $\pm$ 0.12 ^d	0.20 $\pm$ 0.11 ^h	4.27 $\pm$ 0.11 ^{ij}
0.5	-	0	5.47 $\pm$ 0.13 ^{de}	2.27 $\pm$ 0.12 ^{cd}	6.67 $\pm$ 0.12 ^f
0.5	-	1	5.00 $\pm$ 0.09 ^{ef}	2.67 $\pm$ 0.13 ^{bc}	7.07 $\pm$ 0.11 ^{ef}
0.5	-	3	4.07 $\pm$ 0.12 ^{ijk}	1.07 $\pm$ 0.18 ^{ef}	8.27 $\pm$ 0.11 ^d
0.5	-	5	3.73 $\pm$ 0.15 ^k	2.07 $\pm$ 0.15 ^d	7.27 $\pm$ 0.15 ^e
1	-	0	4.00 $\pm$ 0.09 ^{ijk}	2.33 $\pm$ 0.16 ^{cd}	9.00 $\pm$ 0.09 ^c
1	-	1	3.80 $\pm$ 0.11 ^{jk}	2.67 $\pm$ 0.21 ^{bc}	9.13 $\pm$ 0.13 ^c
1	-	3	4.13 $\pm$ 0.13 ^{hijk}	3.07 $\pm$ 0.23 ^{ab}	10.07 $\pm$ 0.15 ^b
1	-	5	4.27 $\pm$ 0.12 ^{hij}	3.40 $\pm$ 0.19 ^a	12.47 $\pm$ 0.23 ^a
Significant			*	*	*

Note: Means followed by the same letter within each column are not significantly different according to Least Significant Difference (LSD) tests at 95 percentages

วิจารณ์ผลการวิจัย

จากการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการงอกของ เมล็ดกล้วยไม้กะเหรี่ยง พบว่า เมล็ดกล้วยไม้สามารถงอกได้ในอาหารสังเคราะห์ทั้ง 2 สูตร ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การงอกแตกต่างกันไป โดยเมล็ดกล้วยไม้ป่ากะเหรี่ยงที่เพาะเลี้ยง

บนอาหารสูตร ND สามารถงอกและเจริญเป็นโปรโตคอร์มได้ อย่างรวดเร็วเมื่อเทียบกับเมล็ดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ทั้งนี้เนื่องจากความแตกต่างกันของธาตุอาหารบางชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งธาตุเหล็กในอาหารสูตร ND ที่อยู่ในรูป Fe-EDTA เมล็ดกล้วยไม้สามารถดูดมาใช้ได้ดีกว่าธาตุเหล็กในรูป FeSO₄ ที่เป็นส่วนประกอบในอาหารสูตร MS

นอกจากนี้ในอาหารสูตร ND ยังมีระดับของธาตุอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของโปรโตคอร์มได้ (Tokuhara and Mii, 1993) นอกจากนี้ปริมาณน้ำตาลในอาหารทั้งสองสูตรยังส่งผลต่อการงอกและการเจริญของเมล็ดกล้วยไม้อีกด้วย การใช้น้ำตาลความเข้มข้นสูงอาจมีผลยับยั้งการเจริญของเมล็ดกล้วยไม้ เนื่องจากความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสทำให้เกิด osmotic stress เนื้อเยื่อพืชต้องนำพลังงานส่วนหนึ่งไปใช้ปรับแรงดันออสโมซิสภายในและภายนอกเซลล์พืชให้สมดุลกัน ทำให้สูญเสียพลังงานส่วนนี้แทนที่จะนำพลังงานไปใช้ในการเจริญเติบโตทั้งหมด ดังนั้นเมล็ดกล้วยไม้จึงมีการเจริญของโปรโตคอร์มได้ช้า (Arditti and Ernst, 1993; Tokuhara and Mii, 1993) นอกจากนี้การใช้น้ำตาลความเข้มข้นสูงยังยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นอ่อนกล้วยไม้อีกด้วย (Wotavova-Novotna *et al.*, 2007)

สำหรับการศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเจริญของโปรโตคอร์มกล้วยไม้กะเหรี่ยง พบว่าโปรโตคอร์มที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA หรือ Kn เกิดยอดจำนวนมาก และเมื่อเปรียบเทียบผลของ BA และ Kn ต่อจำนวนยอดของโปรโตคอร์มพบว่า การเติม BA เข้มข้น 1-5 มก./ล. โปรโตคอร์มมีจำนวนยอดเฉลี่ยเพิ่มขึ้นมากกว่าโปรโตคอร์มที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม Kn ทุกความเข้มข้น ขณะที่อาหารที่เติม NAA เพียงอย่างเดียว พบว่า ไม่มีผลต่อการเพิ่มยอดของโปรโตคอร์ม และอาหารที่เติม NAA ร่วมกับ BA พบว่า มีผลต่อการเพิ่มจำนวนยอดได้ดีกว่าการเติม NAA ร่วมกับ Kn ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่า BA ที่ใช้มีระดับของความเข้มข้นที่เหมาะสมในการกระตุ้นให้โปรโตคอร์มเกิดการแบ่งเซลล์ ขยายของเซลล์ และมีการเจริญไปเป็นยอดได้ ขณะที่ Kn ความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลองอาจไม่สามารถกระตุ้นให้โปรโตคอร์มเกิดการแบ่งเซลล์ได้ ผลที่ได้จึงไม่ดีเท่าการเติม BA เพียงอย่างเดียว ซึ่งผลที่ได้ต่างจาก Kumari *et al.* (2013) ที่พบว่า การเติม NAA เข้มข้น 0.1 มก./ล. ร่วมกับ Kn เข้มข้น 2 มก./ล. สามารถชักนำให้ส่วนยอดกล้วยไม้ *Dendrobium Sonia* 'Earsakul' เพิ่มจำนวนได้มากที่สุด 4.33 ยอด/ชิ้นส่วนพืช ขณะที่การเติม BA เข้มข้น 4 มก./ล. เพียงอย่างเดียว มีจำนวนยอด 2.33 ยอด/ชิ้นส่วนพืช โดยทั่วไปสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินมีหน้าที่กระตุ้นการเจริญของราก และกลุ่มไซโตไคนินกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์และการเจริญของยอด ในการศึกษาครั้งนี้

พบว่า อาหารที่เติม NAA เข้มข้น 1 มก./ล. ร่วมกับ Kn ทุกความเข้มข้น สามารถชักนำให้โปรโตคอร์ม สร้างรากได้จำนวนมาก ซึ่งแตกต่างกับอาหารที่เติม NAA เพียงอย่างเดียว ผลที่ได้สอดคล้องกับ Islam *et al.* (2014) ที่พบว่า PLBs ของกล้วยไม้ลูกผสม (*Dendrobium alba* x *Ascanda dongtarm*) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม NAA 1.0 มก./ล. ร่วมกับ Kn 0.5 มก./ล. มีจำนวนรากเฉลี่ยสูงสุด 4.34 ราก/ชิ้นส่วนพืช ขณะที่โปรโตคอร์มกล้วยไม้ *Dactylo rhizamajalis* มีจำนวนยอดและรากสูงที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม IBA 4.9 μ M และ Kn 4.7 μ M ตามลำดับ (Wotavova-Novotna *et al.*, 2007) จากการย้ายต้นอ่อนกล้วยไม้ที่มีต้นและรากสมบูรณ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อออกปลูกในกระถางที่มีวัสดุปลูกต่างๆ พบว่า กะเหรี่ยงที่ปลูกในกระถางที่มีกาบมะพร้าวสับเพียงอย่างเดียวมีอัตราการรอดชีวิต 83 เปอร์เซ็นต์ ปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้วยไม้ภายหลังจากการย้ายออกจากขวดเพื่อปลูกในสภาพธรรมชาติคือ วัสดุปลูกซึ่งนอกจากการจะช่วยให้การปรับสภาพพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วยังช่วยเพิ่มความแข็งแรงให้กับต้นอ่อนกล้วยไม้อีกด้วย (Chaikhiri and Chouychai, 2017) จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่า ต้นกล้วยไม้กะเหรี่ยงที่ปลูกในกระถางที่มีกาบมะพร้าวสับยังคงมีการเจริญเติบโตได้ดีไบบังคับมีสีเขียวสด ทั้งนี้เนื่องจากกาบมะพร้าวสับเป็นวัสดุปลูกที่เป็นแหล่งธาตุอาหาร มีความพรุนและโปร่งมาก ทำให้รากกล้วยไม้ยึดเกาะได้ดี (Rattanavalee *et al.*, 2014) มีรายงานการใช้วัสดุปลูกต่างๆ ที่มีผลต่ออัตราการรอดชีวิตของกล้วยไม้หลายชนิด เช่น อิฐและก้อนถ่าน (2:1) ก้อนถ่านกาบมะพร้าวสับ ก้อนถ่านและเศษกระเบื้อง (1:1:1) ก้อนถ่านและเศษกระเบื้อง (1:1) มอสและต้นเฟิร์น เป็นต้น (Rattanavalee *et al.*, 2014; Malabadi *et al.*, 2005; Lo *et al.*, 2004; Sunitibala and Kishor, 2009)

สรุปผลการวิจัย

การเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้ป่ากะเหรี่ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และอาหารสูตร ND ที่มีน้ำตาลซูโครส 1 เปอร์เซ็นต์ เป็น

เวลา 30 วัน พบว่า เมล็ดกล้วยไม้ป่ากระรอนสามารถงอกและเจริญเป็นโปรโตคอร์มได้ดีบนอาหารสูตร ND เมื่อนำโปรโตคอร์มมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ND ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0-1 มก./ล. ร่วมกับ BA หรือ Kn ที่ระดับความเข้มข้น 0-5 มก./ล. เพื่อชักนำให้เจริญเป็นต้น เป็นเวลา 90 วัน พบว่า โปรโตคอร์มที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มก./ล. มีจำนวนยอดเฉลี่ยเพิ่มขึ้นสูงสุด ขณะที่อาหารที่เติม NAA 1 มก./ล. ร่วมกับ Kn 5 มก./ล. สามารถชักนำให้ต้นอ่อนมีจำนวนรากเฉลี่ยต่อดัน และมีความสูงต้นเฉลี่ยสูงที่สุดเมื่อนำต้นอ่อนกล้วยไม้ย้ายออกปลูกในสภาพโรงเรือนพบว่า ต้นอ่อนกระรอนที่ปลูกในกระถางที่มีกาบมะพร้าวสับ มีอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุดคือ 83 เปอร์เซ็นต์จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า สามารถขยายพันธุ์กล้วยไม้ป่า

กระรอนได้ภายในระยะเวลาสั้น นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงกล้วยไม้ในขวดยังเป็นการอนุรักษ์ความหลากหลายทางพันธุกรรมเพื่อไม่ให้กล้วยไม้ป่าสูญพันธุ์จากประเทศไทยได้อีกด้วย

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับงบประมาณสนับสนุนจากสำนักบริหารโครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาที่สนับสนุนงบประมาณในการวิจัยประจำปี 2558

References

- Arditti, J. and Ernst, R. 1993. Micropropagation of orchid. John Wiley & Sons.: New York.
- Borasee, B. and Theanhom, A.A. 2014. *In vitro* seed germination and seedling development of *Rhynchostylis coelestis*. Khon Kaen Agr. J. 45(Suppl. 3): 524-528.
- Chaikhiri, A. and Chouychai, W. 2017. Effect of media culture on growth of *Cymbidium finlaysonianum* in vitro and effect of fertilizer on acclimatization. Khon Kaen Agr. J. 45(Suppl. 1): 1197-1202.
- Islam, M.N., Nasiruddin, K.M. and Amin, M.A. 2014. *In vitro* growth and multiplication of a hybrid orchid (*Dendrobium alba* x *Ascanda dongtarm*) with different concentration of plant growth regulators. J. Bios. Agric. Res. 1: 27-33.
- Kongbangkerd, A., Ratchawang-inn, T., Thongkum, W., Paramee, S. and Promthep, K. 2007. A survey of orchids at Phurua national park, Phurua district, Loei province. NU Science Journal. 4(1): 53-66.
- Kumari, P., Sabina, G.T. and Rajmohan, K. 2013. Influence of plant growth regulators on *in vitro* clonal propagation of *Dendrobium Sonia* 'Earsakul'. J. Bio Innovat. 2: 51-58.
- Lo, S.F., Nalawade, S.M., Kuo, C.L., Chen, C.L. and Tsay, H.S. 2004. Asymbiotic germination of immature seeds, plantlet development and *ex vitro* establishment of plants of *Dendrobium tosaense* makino-A medicinally important Orchid. In Vitro Cell Dev. Biol. Plant. 40: 528-535.
- Malabadi, R.B., Mulgund, G.S. and Kallappa, N. 2005. Micropropagation of *Dendrobium nobile* from shoot tip sections. J. Plant Physiol. 162(4): 473-478.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A reverse medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15(3): 473-497.
- Pradhan, S., Tiruwa, B., Subedee, B.R. and Pant, B. 2014. *In vitro* germination and propagation of a threatened medicinal orchid: *Cymbidium alojfolium* (L.) Sw. through artificial seed. Asian Pac. J. Trop. Biomed. 4:

971-976.

Rattanaalee, S., Piyaporn, S. and Surapon, S. 2014. *In vitro* tissue culture of *Dendrobiumkon tumense* Gagnep. KKU Research Journal. 19: 399-413.

Singh, B. and Voletri, S.R. 1995. Research and achievements. Div. Floriculture & Landscaping, Indian Agricultural Research Institute, New Delhi.

Sunitibala, H. and Kishor, R. 2009. Micropropagation of *Dendrobium transparens* L. from axenic pseudobulb segments. Indian J. Biotechnol. 8: 448-452.

Tokuhara, K. and Mii, M. 1993. Micropropagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* by culturing shoot tips of flower stalk buds. Plant Cell Rep. 13(1): 7-11.

Wotavova-Novotna, K., Vejsadova, H. and Kindlmann, P. 2007. Effects of sugars and growth regulators on *in vitro* growth of *Dactylorhiza* species. Biol. Plan. 51(1): 198-200.